Iranian Food Science and Technology
Research Journal
Vol. 16, No. 5, Dec- Jan 2021, p. 643-653

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 16، شماره 5، آذر- دی 1399، ص. 653-643

مقاله علمی- پژوهشی

اسانس پونه: ترکیبات شیمیایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنل کل و اثر سایتوتوکسیک آن بر رده سلولی HT29

هادی تناور[1]- حسن برزگر[2]*- بهروز علیزاده بهبهانی[3]- محمد امین مهرنیا[3]

تاریخ دریافت: 1398/09/28
تاریخ پذیرش: 1398/10/25

چکیده

گیاه پونه با نام علمی *Mentha pulegium* متعلق به خانواده نعناعیان است. در این پژوهش پس از استخراج اسانس به روش تقطیر با آب، ترکیبات شیمیایی اسانس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی شناسایی شد. فعالیت آنتی‌کسیدانی اسانس پونه به روش‌های بررسی توانایی مهارکنندگی رادیکال DPPH و ABTS و همچنین میزان مقاومت در برابر اکسیداسیون لینولئیک اسید و تغییر رنگ بتاکاروتن بررسی شد. سنجش میزان ترکیبات فنلی کل با استفاده از روش فولین سیوکالتو محاسبه گردید. تعیین میزان فلاونوئید به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید صورت گرفت. اثر سایتوتوکسیک اسانس پونه در غلظت‌های مختلف اسانس (1، 3/125، 6/25، 12/5، 25، 50، 100 و 200 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در برابر رده سلولی سرطان روده بزرگ (HT29) با استفاده از روش MTT بررسی شد. نتایج نشان داد که اسانس پونه دارای 25 ترکیب است که عمده‌ترین ترکیبات شیمیایی موجود در آن شامل دی ال- لیمونن 28/44%، دی- کاروون 18/76%، اوکالیپتول 8/86% و پولگون 8/65% بود. میزان مهار رادیکال‌های آزاد اسانس پونه با DPPH و ABTS به‌ترتیب 51/5% و 53/43% بود. میزان مقاومت اسانس پونه در برابر اکسیداسیون لینولئیک اسید و تغییر رنگ بتاکاروتن برابر با 59/22 درصد بود. میزان فنل کل اسانس و فلاونوئید به‌ترتیب برابر با 73/35 میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم اسانس و 19/9 میلی‌گرم کوئرستین بر اکی‌والان بود. نتایج اثر سایتوتوکسیک اسانس پونه نشان داد که درصد زنده‌مانی سلول‌های HT29 به‌ترتیب 100، 70/21، 61/26، 51/98، 35/12، 24/44، 18/65 و 10/92 بود. براساس نتایج به‌دست آمده با افزایش غلظت اسانس پونه، تاثیر بر رده سلولی HT29 افزایش یافته و درصد زنده‌مانی سلول‌های HT29 کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: اسانس پونه، بتاکاروتن لینولئیک اسید، فلاونوئید کل، کروماتوگرافی گازی.

مقدمه

رادیکال آزاد، به اتم یا مولکولی که دارای مولکول‌ها یا اتم‌هایی حاوی الکترون جفت‌نشده در لایه الکترونی هستند گفته می‌شود. این ترکیبات به دلیل ناقص بودن لایه آخر الکترونی خود میل ترکیبی بالایی از خود نشان می‌دهند و پیوسته به بیومولکول‌های طبیعی بدن نظیر اسیدنوکلئیک، پروتئین و اسیدهای آمینه حمله کرده و موجب اختلال در عملکرد آن‌ها می‌شوند (زربان و همکاران، 1383). فعالیت رادیکال‌های آزاد و محصولات حاصل از اکسیداسیون آن‌ها موجب آثار نامطلوب حسی و تغذیه‌ای مانند ایجاد بد طعمی، نابودی ویتامین‌ها و تخریب اسیدهای چرب ضروری می‌گردند. این ترکیبات با تولید ترکیبات سمی و آسیب به ماده ژنتیک سلولی، سبب بیماری‌های قلبی و عروقی و انواع سرطان‌ها نیز می‌شوند (کامکار و همکاران،1390).

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که با جذب رادیکال‌های آزاد به خود موجب کند کردن سرعت اکسیداسیون و یا حذف آن‌ها شده و به این ترتیب بدن را از آثار نامطلوب رادیکال‌های آزاد حفظ می‌کنند (اخباری و همکاران، 1394). ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به‌طور طبیعی در بدن افراد وجود دارند و باعث حفظ فشار اکسیداتیو می‌شوند، به این صورت که همواره میان تولید رادیکال‌های آزاد و عملکرد ترکیبات آنتی‌اکسیدانی تعادل برقرار است (کامکار، 1388). در بسیاری از موارد به دلیل افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و یا اختلال در عملکرد ترکیبات آنتی‌اکسیدانی این تعادل برهم خورده، لذا نیاز است تا از مواد غذایی به‌عنوان منبع تامین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی استفاده شود (زربان و همکاران، 1383). آنتی‌اکسیدان‌ها به دو صورت سنتزی و طبیعی در دسترس هستند (شهسواری و همکاران، 1387). در صنعت غذا از آنتی‌اکسیدان‌های

1، 2 و 3- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: hbarzegar@asnrukh.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v16i5.84722

سنتزی مانند BHA[1] و BHT[2] به‌عنوان نگهدارنده جهت افزایش عمر نگهداری مواد غذایی و جلوگیری از آثار نامطلوب اکسیداسیون استفاده می‌شود (برزگر و همکاران، 1397 و اخباری و همکاران، 1394). امروزه با پیشرفت علم و انجام پژوهش‌های جدید در ایمن و بی‌خطر بودن استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی تردیدهایی ایجاد شده و اقبال عمومی به مواد طبیعی و گیاهی که در کنار داشتن آثار آنتی‌اکسیدانی قوی فاقد عوارض جانبی باشند بیش از ترکیباتی سنتزی شده است (بهنام و همکاران، 1392). گیاهان دارویی از جمله موادی هستند که مصرف آن‌ها در بسیاری از جوامع به‌خصوص در کشور ایران به دلیل ویژگی‌های دارویی، ایجاد خاصیت نگهدارندگی مطلوب در موادغذایی و ایجاد عطر و طعم مناسب رواج یافته است. می‌توان گفت که تقریبا تمامی روغن‌های ضروری استخراج شده از گیاهان دارویی توانایی مهار رادیکال‌های آزاد را دارند، لذا مطالعه جهت یافتن گیاهان با بیش‌ترین اثر آنتی‌اکسیدانی امری ضروری محسوب می‌شود (کامکار و همکاران،1390). این ترکیات به‌صورت متابولیت‌های ثانویه در گیاهان تولید شده و شامل موادی مانند فلاونوئید، تانن و آنتوسیانین‌ها می‌شوند (طباطبایی یزدی و همکاران، 1397). در بسیاری از پژوهش‌های پیشین بیان شده است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی رابطه معنی‌داری با میزان ترکیبات فنلی گیاهان دارد. میزان این ترکیبات به عوامل گوناگونی مانند شرایط محیطی، جنس و گونه گیاه و شرایط رشد و برداشت بستگی دارد (کامکار، 1388). ترکیبات فنلی با داشتن قابلیت احیاکنندگی و شلاته‌کنندگی خود مانع اثر نامطلوب رادیکال‌های آزاد بر بافت ماده غذایی و بدن انسان می‌شوند و بدین صورت آثار نامطلوب اکسیداسیون را کاهش می‌دهند (مولودی و همکاران، 1397).

Mentha pulegium L. یکی از گونه‌های پونه محسوب می‌شود و در خانواده نعناعیان قرار دارد (اصلانی و همکاران، 1392). پولگون[3] از مهم‌ترین ترکیبات آن می‌باشد که موجب عطر و طعم تند نعنایی در گیاه می‌شود (غلامی پورناکی و همکاران، 1396). اثر آنتی‌اکسیدانی این گیاه به اثبات رسیده است، در بسیاری از پژوهش‌های پیشین این اثر را به ترکیبات فنولیک مرتبط دانسته‌اند. این احتمال وجود دارد که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاه پونه با اختلال در عملکرد رادیکال‌های آزاد موجب حفظ ماده ژنتیک و پروتئین‌ها از تاثیرات نامطلوب شوند (پژوهی و همکاران، 1389).

یکی از عوارضی که مصرف مواد غذایی ناسالم در بدن ایجاد می‌کنند سرطان است. لذا این مسئله ایجاب می‌کند تا تمام مواد غذایی از لحاظ عدم سمیت و ایمنی مورد ارزیابی قرار گیرند. سرطان کولون به تکثیر بیش از حد سلول‌های روده بزرگ گفته می‌شود و درمان آن با وجود متاستازهای فراوان مشکل است (نصیری و همکاران، 1396). این نوع سرطان سومین سرطان رایج در دنیا است (یونسی و همکاران، 1396). برای درمان سرطان کولون از روش‌هایی مانند جراحی، شیمی درمانی و پرتو درمانی استفاده می‌کنند که اثر بخشی آن‌ها قابل ملاحظه نبوده و عوارض جانبی مانند نابودی سلول‌های سالم را نیز به همراه دارند (خلیلی و همکاران، 1395). در پژوهش‌های اخیر به نقش ترکیبات دارویی با منشاء گیاهی مانند اسانس‌ها که فاقد عوارض جانبی هستند اشاره شده است (پیروزمند و همکاران، 1397). هدف از پژوهش حاضر، شناسایی ترکیبات شیمیایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنل کل، فلاونوئید کل و سمیت سلولی اسانس پونه بر رده سلولی سرطان کولون روده (HT29) بود.

مواد و روش‌ها

تمامی مواد مورد نیاز شامل: رادیکال DPPH[4] (سیگما-آلدریچ، آمریکا)، بتاکاروتن لینولئیک اسید (سیگما-آلدریچ، آمریکا)، رادیکال کاتیون ABTS[5] (سیگما-آلدریچ آمریکا)، پرسولفات سدیم (مرک آلمان)، معرف فولین سیوکالتو (مرک، آلمان)، کربنات سدیم (سامچون، کره)، الکل 96 درصد (زکریای جهرم)، متانول (مرک، آلمان)، نیتریت سدیم (سام چونگ، کره)، آلومینیوم تری کلراید (یونی، چم)، سود (مرک، آلمان)، محیط کشت DMEM[6] (سیگما-آلدریچ، آمریکا)، DMSO[7] (مرک، آلمان) و بوتیل هیدروکسی تولوئن (سیگما-آلدریچ، آمریکا) خریداری شدند.

تهیه اسانس

اسانس پونه با نام علمی *Mentha pulegium* از شرکت جوهره طعم مشهد (مشهد، خراسان رضوی) تهیه شد. لازم به ذکر است نحوه استخراج اسانس به روش تقطیر با آب صورت گرفت.

شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس پونه با استفاده از GS-MS

تزریق 1 میکرولیتر اسانس پونه به دستگاه کروماتوگرافی گازی[8] (Agilent Technologies 7890 A)با ستونی به طول 30 متر، قطر داخلی 0/25 میلی‌متر و ضخامت لایه داخلی 0/25 میکرومتر (Agilent

1 Butylated hydroxyanisole
2 Butylated hydroxytoluene
3 Pulegone
4 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
5 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
6 Dulbecco's Modified Eagle Medium
7 Dimethyl sulfoxide
8 Gas Chromatography-Mass Spectrometry

(Technologies Inc.,HP-5 MS) متصل به طیف‌نگار جرمی (Agilent Technologies 5975) جهت شناسایی ترکیبات اسانس استفاده شد. دمای ابتدایی ستون 40 درجه سانتی‌گراد تنظیم شد که با نرخ رشد 2/5 درجه سانتی‌گراد بر دقیقه تا 250 درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. از گاز هلیوم به‌عنوان حامل با سرعت 1/1 میلی‌لیتر در دقیقه و انرژی یونیزاسیون70 الکترون ولت استفاده گردید. با استفاده از طیف نرمال آلکان‌ها، شاخص بازداری آن‌ها و رجوع به فرهنگ ترکیبات طبیعی شناسایی نوع ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس پونه صورت پذیرفت (Alizadeh Behbahani and Fooladi., 2018).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس پونه

بررسی توانایی مهارکنندگی رادیکال DPPH

در این روش قابلیت احیا کردن ترکیبات اکسیدکننده توسط اسانس پونه به‌وسیله ارزیابی میزان بی‌رنگ شدن محلول بنفش معرف ۲،2- دی فنیل-1- پیکریل هیدرازیل اندازه‌گیری شد. ابتدا 1 میلی‌لیتر از اسانس خالص پونه به 3 میلی‌لیتر معرف ۲،2- دی فنیل-1- پیکریل هیدرازیل 0/1 میلی‌مولار افزوده گردید. نمونه‌ها به مدت 30 دقیقه در دمای محیط و محفظه تاریک قرار داده شدند. بعد از سپری شدن زمان فوق میزان جذب نمونه‌ها در طول موج 517 نانومتر قرائت گردید. از متانول به‌عنوان نمونه شاهد استفاده شد Brand-Williams *et al.*, (1995). میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از معادله 1، محاسبه شد.

$$\text{فعالیت حذف کنندگی رادیکال آزاد} = \frac{\text{جذب نمونه اسانس} - \text{جذب نمونه کنترل}}{\text{جذب نمونه کنترل}} \times 100 \quad (1)$$

بررسی توانایی مهارکنندگی رادیکال ABTS

در این آزمون ابتدا یک محلول 7 میلی‌مولار ABTS در آب تهیه شد و با نسبت 1:1 با محلول 2/45 میلی‌مولار پرسولفات سدیم مخلوط گردید. جهت تولید رادیکال‌های کاتیونی ABTS محلول حاصل به مدت 16 ساعت در دمای محیط و تاریکی قرار داده شد. پیش از شروع آزمون محلول $ABTS^+$ با متانول تا جذب 0/2±0/7 در طول موج 734 نانومتر رقیق شد. سپس 0/1 میلی‌لیتر از اسانس پونه و 3/9 میلی‌لیتر از محلول رقیق شده ABTS با هم مخلوط شدند. میزان جذب نمونه پس از گذشت 6 دقیقه در طول موج 734 نانومتر خوانده شد (Shan *et al.*, 2005). درصد فعالیت حذف رادیکال با استفاده از معادله 2، محاسبه گردید.

$$\text{درصد جذب رادیکال} = \frac{\text{جذب نمونه اسانس} - \text{جذب نمونه شاهد}}{\text{جذب نمونه شاهد}} \times 100 \quad (2)$$

بررسی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی به روش بتاکاروتن-لینولئیک اسید

قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس پونه در این روش با استفاده از میزان مقاومت در برابر اکسیداسیون لینولئیک اسید و تغییر رنگ بتاکاروتن توسط رادیکال‌های آزاد مورد ارزیابی قرار گرفت. با استفاده از این روش از تولید ترکیبات فرار و هیدروپراکسیدهای کونژوگه جلوگیری می‌شود (Alizadeh Behbahani *et al.*, 2019). فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها با استفاده از معادله 3، محاسبه گردید.

$$\text{درصد بازدارندگی} = \frac{\text{جذب کنترل بعد از 120 دقیقه} - \text{جذب نمونه بعد از 120 دقیقه}}{\text{جذب کنترل بعد از 120 دقیقه} - \text{جذب کنترل در زمان صفر}} \times 100 \quad (3)$$

تعیین فنل کل

سنجش میزان ترکیبات فنلی کل با استفاده از روش فولین سیوکالتو محاسبه گردید. برای این منظور ابتدا غلظت‌های 1000، 10000، 12000 و 14000 از اسانس پونه با کمک الکل 96% تهیه شد. 1 میلی‌لیتر از هر کدام از غلظت‌های گفته شده به 2/5 میلی‌لیتر معرف فولین 10% افزوده گردید. پس از گذشت 2/5 دقیقه، 2 میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم 7/5 % به نمونه‌ها افزوده شد و مواد به‌خوبی با هم ترکیب شدند. میزان جذب نمونه‌ها پس از سپری شدن 1 ساعت در طول موج 725 نانومتر قرائت گردید. میزان ترکیبات فنلی کل با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید و برحسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم اسانس بیان شد (دهقان و همکاران، 1397).

ترکیبات فلاونوئیدی

تعیین میزان فلاونوئید به کمک روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید صورت گرفت. 1 میلی‌لیتر از اسانس خالص به 75 میکرولیتر نیتریت سدیم 5% افزوده و به مدت 6 دقیقه انکوبه گردید. پس از گذشت زمان فوق 150 میکرولیتر آلومینیوم تری کلراید 10% اضافه و 5 دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. در نهایت پس از افزودن 1 میلی‌لیتر سود 1 مولار میزان جذب در طول موج 510 نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان فلاونوئید موجود در اسانس بر حسب میلی‌گرم کوئرسیتین بر اکی‌والان گزارش گردید (Hossain and Rahman., 2011,.Barzegar *et al.*, 2019).

سمیت سلولی

اثر سمیت سلولی اسانس پونه در برابر رده سلولی سرطان روده بزرگ (HT29) با استفاده از روش MTT اندازه‌گیری شد. سلول‌ها در محیط DMEM حاوی قند بالا (10% حجمی/ حجمی)، پنی‌سیلین و استرپتومایسین در دمای 37 درجه سانتی‌گراد، 5% دی‌اکسیدکربن

انکوبه شدند. میزان 10^5 سلول به هر چاهک اضافه گردید. سپس محیط کشت DMEM، 200 میکرولیتر سرم جنینی گاو و رقت‌های (1، 3/125، 6/25، 12/5، 25، 50، 100 و 200 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس) به چاهک‌ها اضافه شد. تکثیر سلولی با استفاده از 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium بعد از گذشت 24 ساعت به صورت زیر صورت گرفت. 30 میکرولیتر از محلول MTT با غلظتی برابر با 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به تمام چاهک‌ها افزوده و صفحات به مدت 3 ساعت در انکوباتور دی‌اکسیدکربن نگهداری شدند. پس از حذف محیط 200 میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد و میزان جذب در طول موج 570 نانومتر با استفاده از دستگاه الایزاریدر قرائت گردید. با استفاده از سلول‌های کنترل منحنی زنده‌مانی سلولی ترسیم گشت (Alizadeh Behbahani *et al*., 2019).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه، با استفاده از SPSS جهت آنالیز داده‌ها استفاده شد.

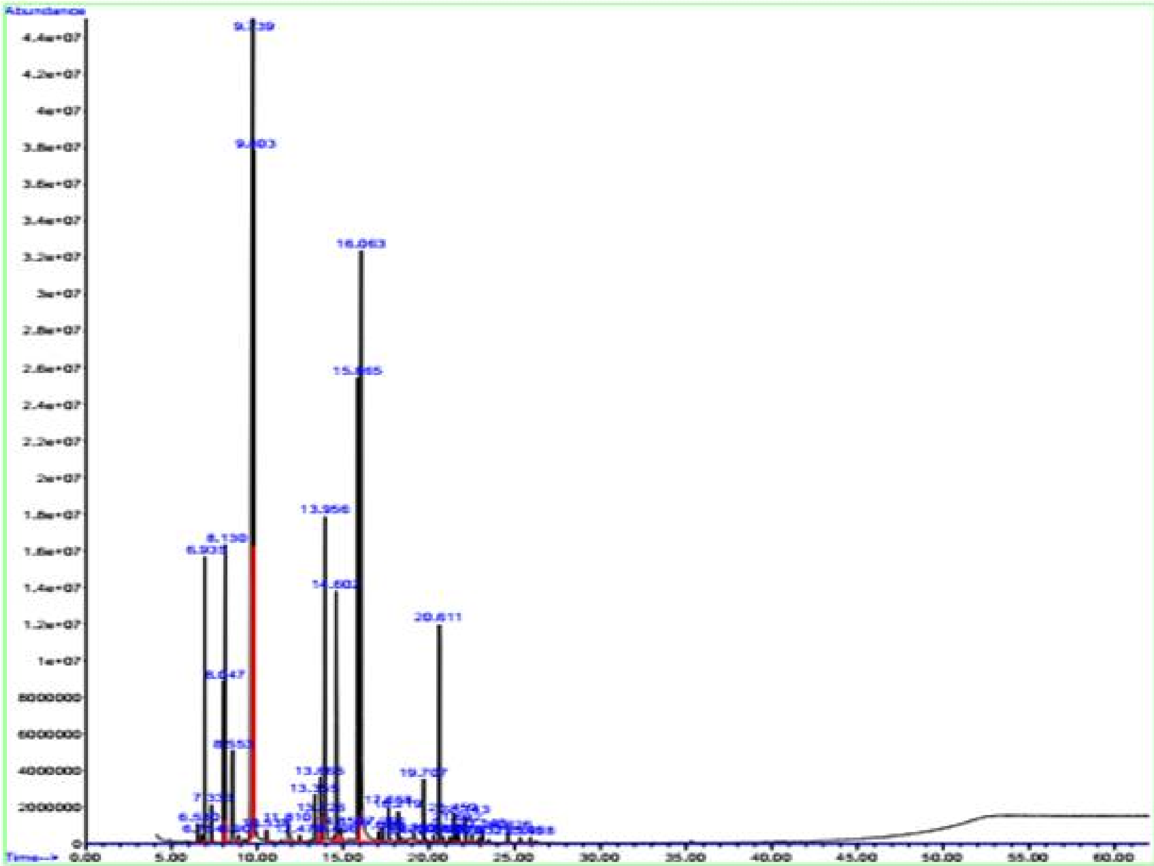
نتایج و بحث

شناسایی ترکیبت شیمیایی اسانس پونه

با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی 25 ترکیب از اسانس پونه شناسایی شد که نام و درصد هر کدام از این ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در جدول 1، ذکر شده است. عمده‌ترین ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس پونه شامل دی ال- لیمونن 28/44%، دی- کاروون 18/76% اوکالیپتول 8/86% و پولگون 8/65% بود. اخباری و همکاران (1394)، با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی ترکیبات عصاره پونه کوهی را شناسایی کردند. دی-کارون 57/2% و لیمونن 15/7% اجزای عمده شناسایی شده بودند. Mahboubi and Hagi (2008)، عمده‌ترین ترکیبات اسانس پونه را منتول 40/6-51/6%، منتون 7/3-20%، 1و8- سینئول و پولگون 18/5-11/1% و پولگون 7-3/9% ذکر کردند. Marzouk و همکاران (2008)، ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس پونه را با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی شناسایی کرده و پیپریتون 38%، پیپرتنون 33%، منتون 3% و پولگون 2/3% را به‌عنوان عمده‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده آن معرفی کردند. Teixeira و همکاران (2012) مطالعاتی جهت شناسایی ترکیبات شیمیایی و قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس پونه کشور پرتغال انجام دادند و 53 ترکیب متفاوت از این اسانس گیاهی شناسایی کردند که منتون 35/9%، پولگون 23/2% و نئومنتون 9/2% بیش‌ترین فراوانی را در میان سایر ترکیبات شناسایی شده داشتند. Ahmed و همکاران (2018) اثر روش‌های خشک کردن بر بازده و ترکیب شیمیایی اسانس پونه بومی کشور مصر را مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران 14 ترکیب شیمیایی از اسانس پونه را شناسایی کردند که در این بین پولگون 57/8%، منتون 9/5% و لیمونن 6/9% از عمده‌ترین ترکیبات شناسایی شده بودند. به‌طور کلی می‌توان بیان کرد نوع و میزان ترکیب‌های شناسایی شده اسانس پونه در پژوهش حاضر با سایر پژوهش‌های انجام شده دارای تفاوت‌هایی بود. بسیاری از پژوهشگران دلیل این تفاوت‌ها را به عواملی همانند شرایط آب و هوایی رشد گیاه، زمان و نوع کشت، نوع ترکیبات خاک منطقه، گونه گیاه، فصل برداشت گیاه، نحوه خشک کردن و استحصال اسانس ذکر کرده‌اند.

جدول 1- ترکیبات شیمیایی اسانس پونه با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی

شماره	نام ترکیبات تشکیل دهنده	درصد
1	α.-Pinene	3/26
2	Camphene	0/44
3	Sabinene	2/07
4	β.-Pinene	4
5	β.-Myrcene	1/46
6	dl-Limonene	28/44
7	Eucalyptol	8/86
8	γ.-Terpinene	0/21
9	Linalool	0/63
10	Menthone	1/75
11	Borneol	0/55
12	Levomenthol	6/02
13	Neodihydrocarveol	6/45
14	Pulegone	8/65
15	D-Carvone	18/76
16	Bornyl acetate	0/17
17	Dihydrocarvyl acetate	0/49
18	β.-Bourbonene	0/94
19	Caryophyllene	3/09
20	α.-Humulene	0/41
21	Epi-bicyclosesquiphellandrene	0/26
22	Germacrene	0/45
23	Bicyclogermacrene	0/13
24	Naphthalene	0/2
25	Caryophyllene oxide	0/21
کل		**97/9**



شکل 1- کروماتوگرام اسانس پونه.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس پونه

با استفاده از آزمون تعیین قدرت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH می‌توان خاصیت هیدروفیلی یا هیدروفوبی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی را پیش‌بینی نمود (صبورا و همکاران، 1392). مبنای این روش استفاده از رادیکال آزاد ۲،2- دی فنیل-1- پیکریل هیدرازیل است که کاهش شدت رنگ محلول طی احیا شدن رادیکال ۲،2- دی فنیل-1- پیکریل هیدرازیل توسط ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با استفاده از دستگاه طیف سنجی اندازه‌گیری می‌شود (مولودی و همکاران، 1397). نتایج مربوط به آزمون فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH در جدول 2، ذکر شده است. میزان مهار رادیکال‌های آزاد با این روش 51/5% اندازه‌گیری شد. کامکار و همکاران (1390)، قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی پونه را با روش DPPH به‌ترتیب 1765، 100، 50 و 53/8 میکروگرم بر میلی‌لیتر برحسب IC_{50} گزارش کردند. نتایج نشان داد که عصاره پونه به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه خود قابلیت استفاده در موادغذایی را دارند. قادرمرزی و همکاران (1394)، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH را 834/3 میکروگرم بر میلی‌لیتر برحسب IC_{50} گزارش کردند که نسبت به BHT فعالیت قابل ملاحضه‌ای محسوب می‌شود. اخباری و همکاران (1394)، میزان قدرت مهارکنندگی عصاره پونه کوهی را با روش DPPH اندازه‌گیری کردند. نتایج نشان داد با وجود این که حلال مورد استفاده جهت استخراج عصاره غیرقطبی بوده است اما باز هم این عصاره گیاهی قدرت آنتی‌اکسیدانی معنی‌داری از خود نشان داد. Ghazghazi و همکاران (2013) میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره استخراجی از برگ گیاه پونه را با استفاده از روش DPPH ارزیابی کردند که در این بین اسانس استخراجی دارای قدرت بیشتری بود. Fatiha و همکاران (2015) میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی سه گونه *Mentha spicata*، *Mentha pulegium* و *Mentha rotundifolia* با استفاده از روش DPPH به‌ترتیب 16/2، 42/7 و 71/3 میکروگرم بر میلی‌لیتر بر حسب IC_{50} گزارش کردند. Sbayou و همکاران (2016) قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس پونه را به روش DPPH اندازه‌گیری کردند. نتایج

این پژوهشگران نشان داد که میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس بر حسب IC_{50} برابر با 16/03 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. Ahmed و همکاران (2018) اثر روش‌های مختلف خشک کردن بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی را به روش DPPH مورد ارزیابی قرار دادند و بیان کردند اسانس پونه خشک شده توسط آون در دمای 50 درجه سانتی‌گراد بیش‌ترین اثر مهارکنندگی را از خود نشان داد. Politeo و همکاران (2018) قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی و متانولی پونه بومی کشور بوسنی را با استفاده از روش DPPH اندازه‌گیری کردند. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری در قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها وجود ندارد.

اصول کلی تعیین قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس با استفاده از رادیکال ABTS به این صورت است که ابتدا با استفاده از پتاسیم پرسولفات، ABTS را در معرض اکسیداسیون قرار می‌دهیم تا رادیکال $ABTS^+$ ایجاد شود (اکبری و همکاران، 1397). در نهایت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی اسانس پونه رادیکال‌های تولیدی $ABTS^+$ را مهار کرده و رنگ محلول از سبزآبی اولیه به محلولی بی‌رنگ تغییر پیدا می‌کند. قدرت آنتی‌اکسیدانی این اسانس گیاهی با ثبت تغییرات کاهش جذب به‌وسیله دستگاه طیف‌سنجی تعیین گردید (طاهانژاد و همکاران، 1391). نتایج این آزمون در جدول 2، آورده شده است. Alpsoy و همکاران (2011) قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره پونه را 0/97 میلی‌مول ترولکس بر گرم وزن خشک نمونه گزارش کردند Ghazghazi و همکاران (2013) قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی و اسانس پونه را توسط این روش به‌ترتیب 44 و 0/14 میکروگرم بر میلی‌لیتر بر حسب IC_{50} بیان کردند. Fatiha و همکاران (2015) مطالعاتی بر ترکیبات شیمیایی و خواص آنتی‌اکسیدانی سه گونه پونه *Mentha spicata*، *Mentha pulegium* و *Mentha rotundifolia* انجام دادند. نتایج مربوط به فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش ABTS این سه جنس پونه به‌ترتیب 10/3، 30/2 و 40/4 میکروگرم ترولکس بر میلی‌لیتر اسانس بر حسب IC_{50} گزارش شد.

اساس روش بتاکاروتن- لینولئیک مقاومت در برابر بی‌رنگ شدن ترکیب بتاکاروتن است (شهسواری و همکاران، 1387). تغییر رنگ بتاکاروتن در اثر برهمکنش آن با رادیکال‌های آزاد تولیدی در واکنش هیدروپراکسید لینولئیک اسید است. وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی سرعت این تغییر رنگ را کاهش می‌دهد که به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر ثبت می‌گردد (کامکار و همکاران، 1390). مطابق با نتایج حاصل از این آزمون که در جدول 2، ذکر شده است اسانس پونه 59/22 % از اکسیداسیون جلوگیری به عمل آورد. Kamkar و همکاران (2010)، مطالعاتی بر قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس پونه بومی ایرانی انجام دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که قدرت آنتی‌اکسیدانی این اسانس گیاهی به روش بتاکاروتن- لینولئیک اسید قابل ملاحضه نبوده و توانست 26% از اکسیداسیون جلوگیری عمل آورد. Cherrat و همکاران (2013) قدرت آنتی‌اکسیدانی چندین گونه گیاهی از جمله پونه را ارزیابی کرده و قدرت آنتی‌اکسیدانی پونه را در غلظت 10 میکرولیتر در میلی‌لیتر 66/88% گزارش کردند. Sbayou و همکاران (2016) خواص آنتی‌اکسیدانی چندین گونه گیاهی از جمله اسانس پونه را مورد ارزیابی قرار دادند و توانایی این اسانس در مهار اکسیداسیون را 69% گزارش کردند. نتایج این پژوهشگران با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی داشت.

فنل کل اسانس پونه

میزان ترکیبات فنلی اسانس پونه با استفاده از روش فولین سیوکالتو و تکیه بر این واقعیت که قدرت آنتی‌اکسیدانی با ترکیبات فنلی رابطه مستقیم دارد اندازه‌گیری شد (برزگر و همکاران، 1398). نتایج آزمون در جدول 2، ذکر شده است. میزان ترکیبات فنلی از جایگزینی جذب محلول اسانس پونه با غلظت 1000 پی‌پی‌ام در y معادله x 0/1843+ y=0/0132 محاسبه شد. قادرمرزی و همکاران (1394)، به‌منظور ارزیابی اسانس پونه کوهی بر ویژگی‌های فیلم خوراکی هیدروکسی پروپیل سلولز میزان ترکیبات فنلی این اسانس را اندازه‌گیری کردند. نتایج حاصل نشان داد که در غلظت 50 گرم بر لیتر میزان این ترکیبات برابر با 276/5 میلی‌گرم بر لیتر نمونه می‌باشد. Teixeira و همکاران (2012) میزان ترکیبات فنلی اسانس پونه را 0/7 میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن نمونه گزارش دادند. Ghazghazi و همکاران (2013) در پژوهش خود میزان ترکیبات فنلی اسانس پونه را 43/4 میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک گزارش نمودند. Fatiha و همکاران (2015) ویژگی‌های شیمیایی و آنتی‌اکسیدانی چندین اسانس گیاهی از جمله پونه را مورد ارزیابی قرار دادند و میزان ترکیبات فنلی آن را 6/1 میلی-گرم گالیک اسید به گرم وزن خشک گیاه گزارش کردند. Politeo و همکاران (2018) میزان ترکیبات فنلی عصاره آبی و متانولی گیاه پونه متعلق به کشور بوسنی را به‌ترتیب 124/27 و 157/92 میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک گیاه گزارش کردند.

ترکیبات فلاونوئیدی اسانس پونه

فلاونوئیدها از جمله مشتقات ترکیبات فنلی محسوب می‌شوند. این ترکیبات باتوجه به وجود گروه هیدروکسیل در ساختار خود به‌عنوان عوامل احیا کننده با قدرت بالا در نظر گرفته می‌شوند که توانایی مهار رادیکال‌های آزاد را دارند. فلاونوئیدها همچنین توانایی تشکیل کمپلس با ترکیبات پروتئینی از جمله آنزیم‌های موثر در اکسیداسیون نظیر لیپواکسیژناز و الکل دهیدروژناز را دارند و به این صورت در فرآیند اکسیداسیون اختلال ایجاد می‌کنند (یاری و همکاران، 1395). نتایج مربوط به شناسایی ترکیبات فلاونوئیدی در جدول 2، ذکر شده است. با استفاده از روش ذکر شده در این پژوهش ترکیبات فلاونوئیدی در اسانس پونه، 19/9 میلی‌گرم کوئرستین بر اکی‌والان اندازه‌گیری شد. Ghazghazi و همکاران (2013) در نتایج خود میزان ترکیبات

فلاونوئیدی موجود در عصاره پونه را 29/3 بر حسب میلی‌گرم کوئرستین به گرم ماده خشک گیاه بیان کردند. Fatiha و همکاران (2015) ترکیبات فنلی سه گونه پونه شامل *Mentha rotundifolia*،*Mentha pulegium* و *Mentha sicata* را اندازه‌گیری کردند. بیش‌ترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی در گونه *Mentha rotundifolia* مشاهده شد. Politeo و همکاران (2018) میزان ترکیبات فلاونوئیدی عصاره آبی و متانولی پونه بومی کشور مصر را اندازه‌گیری کردند. بر اساس نتایج به دست آمده میزان این ترکیبات در عصاره آبی و متانولی به‌ترتیب 12/7 و 18/58 بر حسب میلی‌گرم کوئرستین به گرم پونه بود

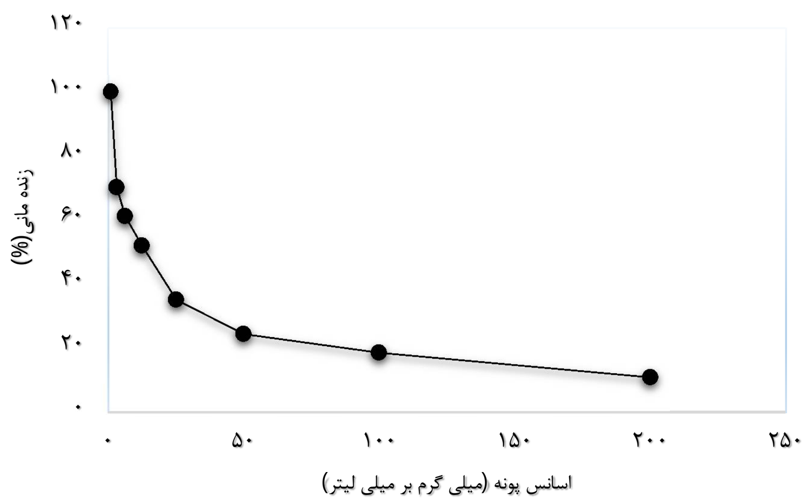
جدول 2- نتایج آزمون‌های شیمیایی اسانس پونه

آزمون شیمیایی	نتایج
فنل کل (میلی‌گرم گالیک اسید/گرم اسانس)	73/35
فلاونوئید (میلی‌گرم کوئرستین/اکی‌والان)	19/9
DPPH (%)	51/5
ABTS (%)	53/43
بتاکاروتن-لینولئیک اسید (٪)	59/22
بوتیل هیدروکسی تولوئن (µg/ml)	11/2
کنترل	0

ارزیابی نتایج سمیت سلولی

نتایج مربوط به آزمون MTT و اثر غلظت‌های مختلف اسانس پونه بر سلول‌های سرطانی HT29 در شکل 2، نشان داده شده است. در این آزمون از غلظت‌های 1، 3/125، 6/25، 12/5، 25، 50، 100 و 200 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس پونه استفاده شد. درصد زنده‌مانی سلول‌های HT29 به‌ترتیب 100، 70/21، 61/26، 51/98، 35/12، 24/44، 18/65 و 10/92 بود

بر اساس نتایج به‌دست آمده با افزایش غلظت اسانس پونه، تاثیر بر رده سلولی HT29 افزایش پیدا کرد و درصد زنده‌مانی سلول‌های HT29 کاهش یافت. بیش‌ترین اثر سمیت سلولی در غلظت 200 میلی-گرم بر میلی‌لیتر و در مقابل کم‌ترین اثر در غلظت 1 میلی‌گرم بر میلی-لیتر مشاهده شد. اصلانی و همکاران (1392)، اثر سیتوتوکسیک عصاره هیدروالکلی پونه را بر سلول‌های سرطانی K562 در غلظت‌های 12/5، 25، 50 و 100 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و زمان‌های 24، 48 و 72 ساعت مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که اثر سمیت سلولی پونه به غلظت و زمان بستگی دارد. بیش‌ترین اثر اسانس در غلظت 50 میلی-گرم بر میلی‌لیتر در 72 ساعت گزارش شد. Shirazi و همکاران (2004) سمیت سلولی ایجاد شده عصاره و اسانس پونه را بر سلول‌های سرطانی Hela، A549 و SKOV3 مورد ارزیابی قرار دادند.



شکل 2- اثر غلظت‌های مختلف اسانس پونه بر رده سلولی HT29.

نتایج نشان داد که عصاره پونه تاثیر چندانی نداشته است اما اسانس این گیاه دارای اثرات قابل توجهی بوده و به‌عنوان عامل بالقوه سمی بر رده‌های سلولی سرطانی انسان معرفی شد. Nikounezhad و همکاران (2014) گیاه پونه را به‌عنوان یک ماده ضدسرطانی مورد مطالعه قرار دادند. در این پژوهش اثر سمیت سلولی عصاره پونه بر سلول‌های سرطان تخمدان C13، سلول‌های سرطان کبد HepG2 و سلول‌های سرطان ریه A549 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که کاهش قابل توجه سلول‌های C13 در غلظت‌های بیش از 2/5 و سلول‌های HepG2 و A549 در غلظت‌های 2/5 تا 10 میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی پونه صورت گرفت. Rocha و همکاران (2019) از

ترکیبات فنلی استخراج شده گیاه پونه جهت درمان اختلالات و بیماری‌های التهابی روده استفاده کردند. نتایج نشان داد که گیاه پونه موجب مهار سلول‌های سرطانی HT29 شد و از تهاجم و تکثیر این سلول‌های سرطانی جلوگیری به عمل آورد. Ouakouak و همکاران (2019) گزارش کردند که اسانس *Mentha citrata* دارای اثر سایکوتوکسیک مناسبی در برابر سلول‌های سرطانی روده بزرگ HCT116 و سلول‌های کبدی HepG2 داشت

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر اسانس پونه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسبی بود. لذا گیاه پونه را که منبع طبیعی داشته و فاقد عوارض جانبی می‌باشد را می‌توان به‌عنوان جایگزینی برای نگهدارنده‌های سنتزی مطرح کرد و از آن در صنعت غذایی بهره برد. با وجود سمیت سلولی و خواص ضدسرطانی اسانس پونه پیشنهاد می‌شود پژوهش‌های گسترده‌تری روی این گیاه در صنعت داروسازی جهت درمان سرطان و ناراحتی‌های گوارشی صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد می‌باشد، لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

اخباری، م.، آقاجانی، ز.، کریمی، ا. و مازوچی، ا. 1394. بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌میکروبی ترکیبات روغنی گیاه *Mentha Longifolia*. مجله تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی، 6(21)، 66-59.

اصلانی، ا.، نقش، ن. و رنجبر، م. 1392. بررسی اثر سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی گیاه پونه در مرحله قبل از گل‌دهی بر لاین سلولی سرطان خون (K562). مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک، 16(10)، 10-1.

اکبری، م.، صادقی ماهونک، ع.ر.، سرابندی، خ. و قربانی، آ. 1397. ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و آنتی‌اکسیدانی عصاره چای سبز ریزپوشانی شده به روش هم‌تبلوری. مجله علوم و صنایع غذایی، 15(85)، 193-179.

برزگر، ح.، علیزاده بهبهانی، ب. و مهرنیا، م.ا. 1398. شناسایی ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضدباکتریایی اسانس ریحان سبز و برهمکنش آن با آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و کلرامفنیکل بر تعدادی از ریزاندامگان عامل عفونت و مسمومیت غذایی. مجله علوم و صنایع غذایی، 90(16)، 125-113.

برزگر، ح.، مهرنیا، م.ا. و علیزاده بهبهانی، ب. 1397. تعیین ترکیبات شیمیایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و اثر ضدمیکروبی اسانس گلپر برفی بر میکروارگانیسم‌های عامل عفونت و مسمومیت غذایی. فصلنامه میکروبیولوژی کاربردی در صنایع غذایی، 4(4)، 28-15.

بهنام، ب. و علی اکبرلو، ج. 1392. اثر آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی و پونه کوهی روی گوشت مرغ نگهداری شده در دمای 4 درجه سانتی‌گراد. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، 23(4)، 543-533.

پژوهی، م.ر.، تاجیک، ح.، آخوندزاده، ا.، گندمی، ح.، احسانی، ع. و شکوهی ثابت جلالی، ف. 1389. ارزیابی ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضدمیکروبی اسانس پونه کوهی (*Mentha Longifolia* L.) و دانه زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) به تنهایی و توأم با نیسین. مجله پزشکی ارومیه، 21(4)، 331-324.

پیروزمند، س.، موسوی، ز.، میرزایی، ا. و روستاییان، ع. 1397. بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه هلیکریزوم آرتمیزیوئیدس، اثرات ضدمیکروبی و سمّیت سلولی آن بر روی رده سلولی سرطان کولون و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزی با روش PCR. مجله دانشگاه علوم پزشکی قم، 12(3) ، 18-9.

خلیلی، ح. و باغبانی آرانی، ف. 1396. سنتز سبز نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه درمنه*Artemisia) (tschernieviana* و بررسی سمیت سلولی آن روی رده‌های سلولی سرطانی کولون (HT29) و نرمال (HEK2). مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، 25(2)، 100-91.

دهقان، ن.، برزگر، ح.، مهرنیا، م.ا. و جوینده، ح. 1397. بررسی اثر افزودن عصاره متانولی پوست سبز بنه *atlantica* (*Pistacia*) بر پایداری اکسایشی روغن سویا. فصلنامه فناوری‌های نوین غذایی، 5(3)، 507-499.

زرزبان، ا.، ملکانه، م.، حسن‌پور، م.، نجاری، م.ت. و آباد، م. 1383. ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی 28 مورد از گیاهان دارویی ایران. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، 11(1)، 13-5.

شهسواری، ن.، برزگر، م.، سحری، م.ع. و نقدیبادی، ح.ع. 1387. بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* *Boiss.*) در روغن سویا. فصلنامه گیاهان دارویی، 4(28)، 68-56.

صبورا، ع.، دادمهر، خ. و رنجبر، م. 1392. سنجش محتوای فنل و فلاونوئید تام و بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره ساقه و برگ 6 گونه میخک وحشی (*Dianthus* L.) ایران. فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، 29(2)، 281-295.

طاهانژاد، م.، برزگر، م.، سحری، م.ع. و نقدی بادی، ح.ع. 1391. ارزیابی فعالیت آنتی‌رادیکالی عصاره پنیرک (*Malva sylvestris* L.) و کاربرد آن در سامانه روغن. فصلنامه گیاهان دارویی، 2(42)، 97-86.

طباطبایی یزدی، ف.، علیزاده بهبهانی، ب.، وسیعی، ع.، مرتضوی، س.ع. و شهیدی، ف. 1395. ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فیتوشیمیایی و ضدمیکروبی اسانس نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) بر جمعیت ریزاندامگان عامل مسمومیت و عفونت غذایی. مجله علوم و صنایع غذایی، 15(76)، 76-67.

غلامی پورناکی، پ.، آقازاده، م. و صادقی، م.ر. 1396. بررسی ترکیب شیمیایی و فعالیت ضدمیکروبی اسانس پونه کوهی (*Mentha pulegium*) منطقه ماکو و اثر مهاری آن بر روی استافیلوکوکوس اورئوس در سوسیس. تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک، 117، 69-77.

قادرمزی، ر.، کرامت، ج. و حسین گلی، س.ا. 1394. تأثیر اسانس پونه کوهی بر ویژگی‌های فیلم خوراکی هیدروکسی پروپیل متیل سلولز. فصلنامه فناوری‌های نوین غذایی، 2(3)، 74-61.

کامکار، ا. 1388. مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره شوید ایرانی. فصلنامه دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گناباد، 15(2)، 11-17.

کامکار، ا.، شریعتی‌فر، ن.، جمشیدی، ا.ح.، جبلی‌جوان، ا.، صادقی، ط. و ضیغم‌منفرد، م.م. 1390. مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره پونه (*Mentha longifolia*)ایرانی در شرایط آزمایشگاهی. فصلنامه گیاهان دارویی، 1(8)، 194-185.

مولودی، ف.، علیزاده خالدآباد، م.، محمودی، ر. و رضازاد باری، م. 1397. ترکیبات شیمیایی، خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی اسانس گیاه مرزنجوش بخارایی (*Origanum vulgar ssp. gracile*) در محیط آزمایشگاهی. مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل، 20(10)، 44-36.

نصیری، ر.، زارع کاریزی، ش.، حیاتی رودباری، ن. و فرهادیار، ن. 1396. بررسی سمیت سلولی نانوذره اکسید سریم روی رده سلولی سرطان کلون HT29و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزیسی کاسپاز 3 و 9. مجله سلول و بافت، 8(3)، 294-303.

یاری، س.، کرمیان، ر. و اسدبیگی، م. 1395. محتوی فنل و فلاونوئید کل در عصاره گونه *Meristotropis xanthioides vassilcz.* و اثر حفاظتی آن بر مسمومیت کبدی القا شده با اتانول. مجله سلول و بافت، 7(3)، 333-323.

یونسی، ب.، میرزایی، ا. و عسگری، ع. 1396. بررسی اثرات سمیت سلولی و آپوپتوزیسی داروی اگزالی پلاتین بر روی رده سلولی سرطان کولون (HT29) و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزیسی کاسپاز 3 و کاسپاز 9 توسط روش Real Time PCR . مجله سلول و بافت، 8(4)، 374-364.

Ahmed, A., Ayoub, K., Jamali Chaima, A., Hanaa, L. & Abdelaziz, C., 2018. Effect of drying methods on yield, chemical composition and bioactivities of essential oil obtained from Moroccan *Mentha pulegium* L. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16(12), 638-643.

Alizadeh Behbahani, B. & Fooladi, AAI., 2018. Evaluation of phytochemical analysis and antimicrobial activities allium essential oil against the growth of some microbial pathogens. *Microbial Pathogensis*, 114, 299-303.

Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M. & Falah, F., 2019. Cumin essential oil: phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. *Microbial Pathogenesis*, 136, 1-6.

Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M. & Falah, F., 2019. Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of syzygium aromaticum essential oil on foodborne pathogens. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 13(1), 875-883.

Alpsoy, L., Sahin, H. & Karaman, S., 2011. Anti-oxidative and anti-genotoxic effects of methanolic extract of *Mentha pulegium* on human lympocyte culture. *Toxicology and Industrial Health*, 27(7), 647-654.

Barzegar, H., Alizadeh behbahani, B. & Mehrnia, M.A., 2019. Quality retention and shelf life extension of fresh beef using *Lepidium sativum* seed mucilage-based edible coating containing *Heracleum lasiopetalum* essential oil: an experimental and modeling study. *Food Science and Biotechnology*,1-12, doi: 10.1007/s10068-019-00715-4.

Brahmi, F., Hauchard, D., Guendouze, N., Madani, K., Kiendrebeogo, M., Kamagaju, L., St´evigny, C., Chibane, M. & Duez, P., 2015. Phenolic composition, in vitro antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian Mentha species: M. spicata (L.), M. pulegium (L.) and M. rotundifolia (L.) Huds (*Lamiaceae*). *Industrial Crops and Products*, 74, 722-730.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. & Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.

Cherrat, L., Espina, L., Bakkali, M., Pag´an, R. & Laglaoui, A., 2013. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas* and *Satureja calamintha* scheele essential oils and an evaluation of their bactericidal effect in combined processes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 22, 221-229.

Ghazghazi, H., Chedia, A., Weslati, M., Trakhna, F., Houssine, S., Abderrazak, M. & Brahim, H., 2013. Chemical composition and in vitro antimicrobial activities of *Mentha pulegium* leaves extracts against foodborne pathogens. *Journal of Food Safety*, 33, 239-246.

Hossain, M.A. & Rahman, S.M.M., 2011. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Research International*, 44, 672-676.

Kamkar, A., Jebelli Javan, A., Asadi, F. & Kamalinejad, M., 2010. The antioxidative effect of iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. *Food and Chemical Toxicology*, 48(7) 1796-1800.

Mahboubi, M. & Haghi, G., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(2), 325-327.

Marzouk, B., Ben Hadj Fredj, M., Chraief, I., Mastouri, M., Boukef, K. & Marzouk, Z., 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from tunisian *Mentha pulegium* L. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 6(1), 78-82.

Nikounezhad, N., Shirazi, F.H. & Kamalinejad, M., 2014. Relative cytotoxicity of fractionated extract of arial parts of *Mentha Pulegium* on three cancer cell lines. *American Journal of Pharmtech Research*, 4(6), 214-223.

Ouakouak, H., Benchikha, N., Hassani, A. & Ashour, M.L., 2019. Chemical composition and biological activity of *Mentha citrate* Ehrh., essential oils growing in southern algeria. *Journal of Food Science and Technology*, 56(12), 5346-5353.

Politeoa, O., Bektašević, M., Carev, I., Jurin, M. & Roje, M., 2018. Phytochemical composition, antioxidant potential and cholinesterase inhibition potential of extracts from *Mentha pulegium* L. *Chemistry and Biodiversity*, 15(12), 1-25.

Rocha, J., Direito, R., Lima, A., Mota, J., Gonçalves, M., Duarte, M.P., Solas, J., Peniche, B.F., Fernandes, A., Pinto, R., Ferreira, R.B., Sepodes, B. & Figueira, M.E., 2019. Reduction of inflammation and colon injury by a pennyroyal phenolic extract in experimental inflammatory bowel disease in mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 118, 1-12.

Sbayou, H., Boumaza, A., Hilali1, A. & Amghar, S., 2016. Antioxidant properties of artemisia herba-alba asso *Mentha pulegium* L. and origanum compactum benth. essential oils. *Journal of Materials and Environmental Science*, 7(8), 2908-2912.

Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M. & Corke, H., 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7749-7759.

Shirazi, F.H., Ahmadi, N. & Kamalinejad, M., 2004. Evaluation of northern iran *Mentha Pulegium* L. cytotoxicity. *Daru Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(3), 106-110.

Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Batista, I., Serrano, C., Matos, O., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Saraiva, J.A. & Leonor Nunes, M., 2012. European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products*, 36(1), 81-87

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 16, No. 5, Dec- Jan 2021, p. 643-653

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 16، شماره 5، آذر - دی 1399، ص. 653-643

Mentha pulegium essential oil: chemical composition, total phenolic and its cytotoxicity on cell line HT29

H. Tanavar[1], H. Barzegar[2*], B. Alizadeh Behbahani[3], M. A. Mehrnia[3]

Received: 2019.11.19
Accepted: 2019.12.24

Introduction: Free radicals activity and their products of their oxidation can cause undesired feeling and nutritional effects such as, awful taste, destroying vitamins and destruction of essential fatty acids. These compounds which are toxic substances and damage the genetic material of cells causing heart and cardio vascular diseases and different type of cancer. Antioxidats absorb free radicals, so they can decelerate oxidation speed, then delete them to save the body from undesirable effects. Pooneh which is called scientifically *Mentha pulegium* belongs to lamiaceae group. The aim of this study was evaluating chemical compounds, antioxidant activity, total phenolic and cytotoxicity of *Mentha pulegium* essential oil (MPEO) on cell line of colon and gut cancer.

Materials and methods: In this study, after extraction of MPEO using condensation the essential oil chemical composition were identified with gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS). Antioxidant activity was measured with radical inhibition ability method DPPH, ABTS and also their resistance against linoleic acid oxidation and changing β-carotene color, was considered. The evaluation of total phenolic composition was carried out using folin-ciocalteu method. To do this, the concentration of 1000, 10000, 1200 and 1400 of MPEO with alcohol was prepared. One mL of each concentration was added to 2.5mL of folin-ciocalteu reagent. After 2.5 minutes, 2ml sodium carbonate was added and mixed well. The rate of sample absorbtion after one hour was 725 nm. Determination of flavonoids range was done with aluminum chloride. MPEO cytotoxicity effects (1, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 mg/ml) on colon cancer cell line (HT29) was performed using MTT method. In this method 30 mL of MTT solution with 5 mg/mL was add to all wells and maintain for 3 hours in carbon dioxide. After removing environment, 200µl DMSO was add to each well and the rate of absorbtion in 570 nm was read usingELISA/microplate reader device. Cell aliveness curve was drawn.

Results and discussion: The results showed that MPEO had 25 compounds, dl-limonene 28.44%, D-carvone 18.76%, Eucalyptol 8.86% and pulegone 8.65% were the top components. The rata of *Mentha pulegium* free radicals control with DPPH and ABTS was 51.5% and 53.43% respectively. The amount of MPEO resistance against oxidation of linoleic acids and color changing in β-carotene was 59.22%. Total phenolic was equal to 73.35 mg gallic acid/ml. The cytotoxicity effects results showed, the percent of HT29 aliveness was 100, 70.21, 61.26, 51.98, 35.12, 24.44, 18.65 and 10.92 respectively. Based on the results, increasing in MPEO concentration, caused increasing in HT29 cell line and decreasing percentage of aliveness. The most cells toxicity was in 200 mg/mL and the less was in 1 mg/mL.

According to the results, in this study MPEO had suitable antioxidant activity, so we can use *Mentha pulegium* as an alternative for synthesis preservatives in food industry.

Keywords: Pooneh essential oil, β-carotene linoleic acid, Total flavonoids, Gas chromatography.

1. MSc. Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technolog, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan ,Mollasani, Iran.
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
(*Corresponding author: hbarzegar@asnrukh.ac.ir)